

BRAIN PRESSURE AND INTRA-OCULAR TENSION DEPRESSING AGENT**Publication number:** JP63230627**Publication date:** 1988-09-27**Inventor:** NAKAYAMA KUNIO; KUMAKURA TOYOAKI;
IWAMOTO MITSUO; YAMAMOTO FUMIHIRO;
MOTOYOSHI YOSHIE; YAMAMOTO SHUICHI;
TATEISHI TAKASHI; HIRAO AKINORI; YAMAMOTO
MASAYUKI; KATO TAKAHARU; SANO TETSURO**Applicant:** NIKKEN CHEMICALS CO LTD**Classification:****- international:** **A61K31/045; A61K31/047; A61P9/00; A61P27/02;
A61P43/00; C07C31/24; A61K31/045; A61P9/00;
A61P27/00; A61P43/00; C07C31/00; (IPC1-7):
A61K31/045; C07C31/24****- European:****Application number:** JP19870062568 19870319**Priority number(s):** JP19870062568 19870319

Report a data error here

Abstract of JP63230627

PURPOSE:To obtain the titled depressing agent containing erythritol as an active ingredient and having strong brain pressure and intra-ocular tension depressing action. **CONSTITUTION:**Erythritol is contained as an active ingredient. The aimed depressing agent is used normally in form of injection or oral medicine. When the agent is used as the injection, the agent obtained by preparing the agent to about 10-40% (W/V) concentration using distillation water for injection and formulating the agent according to a conventional method is used and in case of the oral medicine, the medicine is used as a liquid agent or powder agent having high concentration and they are each administered in dose of 0.3-3g/1kg wt. of the body/day 1-3 times calculated in terms of erythritol.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑤ 日本国特許庁(JP) ⑥ 特許出願公開
 ⑦ 公開特許公報(A) 昭63-230637

⑧ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑨ 公開 昭和63年(1988)9月27日
 A 61 K 37/02 ABE 8615-4C
 ADT
 ADU 審査請求 未請求 発明の数 3 (全9頁)

⑩ 発明の名称 金属触媒による酸化被害の予防へのチオレドキシン化合物類の利用
 ⑪ 特 願 昭62-55458
 ⑫ 出 願 昭62(1987)3月12日
 優先権主張 ⑬ 1986年3月14日 ⑭ 米国(US) ⑮ 839857
 ⑯ 1986年10月20日 ⑰ 米国(US) ⑱ 921287
 ⑲ 発 明 者 ビンセント ビー ビ アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウィンチエスター
 ジェ
 ⑳ 発 明 者 シンシア デイ ミ アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 リン
 リス
 ㉑ 出 願 人 レプリゲン コーポレ アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ州 カンブリ
 ーション
 ツジ ビルディング700 ワン ケンダールスクエア一
 (番地なし)
 ㉒ 代 理 人 弁理士 佐々井 弥太郎 外 1名

明 細 書

1. 発明の名称

金属触媒による酸化被害の予防へのチオレドキシン化合物類の利用

2. 特許請求の範囲

1. 金属触媒による酸化被害を受ける系において、酸化防止有効量のチオレドキシン化合物又はその塩を使用することからなる、金属触媒による酸化被害の予防法。

2. チオレドキシン化合物の酸化防止有効量が約1μMないし約100 μMである、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

3. チオレドキシン化合物が、本質的に大腸菌チオレドキシンの真化シアノゲン阻害でつくられる残基1-37を含有する断片からなるチオレドキシン断片ジチオールペプチドである、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

4. チオレドキシン化合物が、本質的に大腸菌チオレドキシンの真化シアノゲン阻害で残基1-37をつくってから、これをトリプシンで消化させて

つくった残基19-38を含有する断片からなるチオレドキシン断片ジチオールペプチドである、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

5. チオレドキシン化合物が、酸化還元活性ペプチド配列のCys-X-Y-Cys-Lys又はCys-X-Y-Cys又はTrp-Cys-X-Y-Cys-Lys[ここでXとYは20個のアミノ酸の任意のものでありうる。]を含むチオレドキシンで置換された、又はチオレドキシン様のジチオールペプチドである、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

6. チオレドキシン化合物が、酸化還元活性ペプチド配列のA-Cys-X-Y-Cys-Lys-B又はA-Cys-X-Y-Cys-B又はA-Trp-Cys-X-Y-Cys-Lys-B[ここでXとYは20個のアミノ酸の任意のものであり、Aはアミノ酸残基、Bはカルボキシル基残基である。]を含むチオレドキシンで置換された、又はチオレドキシン様のジチオールペプチドである、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

7. 酸化還元活性ペプチド配列がCys-Gly-Pro-Cys-Lys又はCys-Gly-Pro-Cysである、特許請求の

範圍第5項又は第8項に記載の方法。

8. 酸化還元活性ペプチド配列が Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys である、特許請求の範圍第5項又は第8項に記載の方法。

9. チオレドキシン化合物が、大腸菌からのチオレドキシンである、特許請求の範圍第1項に記載の方法。

10. チオレドキシン化合物がβ乳類チオレドキシンである、特許請求の範圍第1項に記載の方法。

11. チオレドキシン化合物又はその塩の酸化防止効果、金属触媒による酸化被害を受ける生物系で金属触媒による酸化を防止するために使用される、特許請求の範圍第1項に記載の方法。

12. 生物系が溶液中又は膜内の脂質である、特許請求の範圍第11項に記載の方法。

13. チオレドキシン化合物が皮膚の処置に使用される、特許請求の範圍第11項に記載の方法。

14. チオレドキシン化合物が食品、薬品及び化粧品への酸化被害の予防に使用される、特許請求の範圍第11項に記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明は金属触媒による酸化被害を予防するためのチオレドキシン化合物の利用に関する。

【先行技術及び問題点】

脂素産生系(オキシラジカル)は、脂素の部分還元型である。遷移金属触媒は、酸化被害を開始するオキシラジカルの発生に、不可欠な役割をもちいると考えられる。オキシラジカルは、炎症、虚血後の組織傷害、老化、発癌性(すなわちDNA損傷)、薬剤作用と薬剤毒性、脂質過酸化、及びタンパク劣化を含めた潤滑の生物学的反応と病状に関与していた。オキシラジカルの検計には、ギルバート・ディー・エル(Gilbert, D.L.)編(1981年)「脂素と生命過程」(Oxygen and Living Processes); 李融の方法; スプリング・フィールド社、ニューヨーク; ハリウェル・ビー(Hallivell, B.)及びガッターリッジ・ジョー・エム・シー(Gutteridge, J.M.C.)(1984年)、Biochem. J. 219巻1-14頁; オースト・エス・ディー(Aust, S.

15. チオレドキシン化合物が長症症状の処置に使用される、特許請求の範圍第11項に記載の方法。

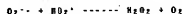
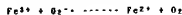
16. 酸化還元活性ペプチド配列の Trp-Cys-X-Y-Cys-Lys [ここでXとYは20個のアミノ酸の任意のものでありうる]を含む、チオレドキシンで誘導された、又はチオレドキシン様のジチオールペプチド。

17. 酸化還元活性ペプチド配列の A-Trp-Cys-X-Y-Cys-Lys-B [ここでXとYは20個のアミノ酸の任意のものであり、Aはアミノ封鎖基、Bはカルボキシル封鎖基である]を含むチオレドキシンで誘導された、又はチオレドキシン様のジチオールペプチド。

18. 酸化還元活性ペプチド配列の Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys を含む、特許請求の範圍第16項又は第17項に記載のチオレドキシンで誘導された、又はチオレドキシン様のジチオールペプチド。

D.), モアハウス・エル・エイ(Morehouse, L.A.)及びトーマス・シー・イー(Thomas, C.E.)(1985年) J. Free Radical Biol. and Med. 1巻3-25頁; 及びシーズ・エッチ(Seitz, H.)編(1985年)「酸化ストレス」(Oxidative Stress)アカデミックプレス社、ニューヨーク・ロンドン)を参照のこと。

脂素及び脂素の部分還元型(すなわち還元脂素物 $O_2^{\cdot-}/H_2O$ 、過酸化水素 H_2O_2 、及びヒドロキシルラジカル $\cdot OH$)と遷移金属との化学は、主に鉄と銅で研究されてきた。還元脂素物の発生は、化学的あるいは脂素的に、金属触媒によるハーバー・ワイズ反応(又は $O_2^{\cdot-}$ によるハーバー・ワイズ)に関連しているものと考えられる。



これらの反応は、遷移金属の不在下に無反応である(すなわち触媒されない反応の速度が遅い)と考えられる。エチレンジアミン四酢酸(EDTA)のようなる鉄キレート化剤は、要する Fe^{2+} (第

二鉄型)をキレート化して、これを可溶型で保持することにより、鉄で触媒されるハーバー・ワイズ反応を促進する。一方、デスフェリオキサミン(デスフェニールメタレート、チバ・ガイザー、ニューヨーク州ホーソン)などの他のキレート化剤は、恐らくは Fe^{2+} の還元又は Fe^{2+} が触媒される H_2O_2 の分解を抑制することによって、鉄で触媒されるハーバー・ワイズ反応を抑制する。幾つかのチオール化合物類と生物学的還元体(すなわちグルタチオン[GSH]、アスコルベート、ジチオスレイトール[DTT])は、個々の系で、鉄の還元を通して鉄で触媒されるハーバー・ワイズ反応を促進するか、又は金属濃度よりかなり高い濃度でフリーラジカル反応を抑制することが示されている。【問題点を解決する手段】

本発明の新規方法は、例えば生物学的反応と疾病状態において金属触媒による酸化の損傷を予防するためにチオレドキシン化合物を使用することからなる。酸化の損傷反応(すなわちハーバー・ワイズ)は開始のために金属触媒を必要とし、金

属の不存在下では無反応と考えられるから、いかなる種類の酸化の損傷も、チオレドキシンにより、汚染金属の金属キレート化を経て、又はスルフィドリルや他のアミノ酸に固有の酸化防止性状によって抑制できる。(金属類は水中と生物系に存在し、従って除去のための配慮をしなければ存在している)。更に詳しくは、本発明は金属濃度と同じ濃度のチオレドキシン化合物を使用して、溶液中又は体内の金属触媒による脂質の過酸化を体外で抑制することに関する。更に、溶液中の鉄及び銅との相互作用のためにチオレドキシンを使用できる。このように、この概念と、本明細書で「チオレドキシン化合物」と呼ばれる類似配列をもったポリペプチド類とを、金属触媒による酸化の損傷又はストレス予防のため生体内外で使用できる。特定の例は癌症の金属キレート化療法、抗癌作用又は毒性による脂質過酸化の抑制剤用、抗炎症剤用、及びDNA損傷の予防などの用途を食む。更に、本明細書で明らかにされたチオレドキシン化合物類は、汚染ないし添加された遷移金

属の存在下の酸化によって不活性化されるようなタンパクその他生物学的に活性のある化合物類、例えば抗生物質とタンパク質の生物活性を保持するために使用でて有利である。チオレドキシンは食品や化粧品の一成分である脂質の過酸化を抑制するから、食品・化粧品業界で一般的酸化防止剤としてチオレドキシンを使用できる。

チオレドキシン化合物類は、汚染ないし添加遷移金属類、例えば鉄、銅、マンガ、バナジウム等の存在下に生物学的活性化合物の酸化による不活性化を予防するために、生体外の系で使用できる。このような生体外の系で使用できるチオレドキシン化合物の水準は、約 $1\mu M$ ないし約 100 mM の範囲にある。最適使用水準は、当業者が容易に決定できる。この最適水準は、存在する金属汚染水準に影響されよう。生物学的活性化合物の生物活性を維持するには、金属水準が高ければ、チオレドキシン化合物も高水準が必要となる。このため、生物活性の安定化が決定されるまで、任意所定の反応容積のアリコートで反応産物のチオレドキシン化

合物で処理できることが明白である。次に生物活性を安定化させる有効量のチオレドキシン化合物を反応産物に、反応容積中の生物活性化合物を安定化させる。生物学的活性化合物、例えば抗生物質やタンパク、ポリペプチドを同成分系よりも連続培養で生産する場合は、産んでいる生物物の生物活性を安定化させるのに有効な量のチオレドキシン化合物を調製の手順によって生物物産に仕込むことができる。チオレドキシン化合物の仕込み量は、この場合も上記のように代表的試験で決定されよう。

上記のように生体内の種々の疾病状態の処置にチオレドキシン化合物類を使用するには、その病気に加った人又は動物に、一般的には全身的に化合物類を投与することによって行なうことができる。特定投与方式は、特定疾病状態の性質と場所に従って行なう。例えば癌症状態の処置は、できるだけ癌腫部位の近くで行なうのが有利である。癌が腫瘍の場合は、その部位への注射が一般に最も有効である。しかし、癌は癌内、癌

口、直腸、又は局所塗布で投与される製剤をも包含できる。悉して投与方式は、類似疾病状態の処置に医薬品を投与するための既知手段に従う。使用できるチオレドキシン化合物水準は約 $1 \mu\text{g/kg}$ ないし約 100 mg/kg の範囲にある。

シロップ剤、エリシシル剤及び懸濁液のような経口投与のための液体単位適量形式をつくるには、組成物の茶匙1杯が所定量の投与チオレドキシン化合物を含有するものをつくる。チオレドキシン化合物を砂糖、風味料、及び防腐剤と一緒に水性ビヒクル中に溶解すると、シロップ剤ができる。エリシシル剤は風味料と一緒に適当な甘味料を加えたアルコール水溶液のビヒクルを使用してつくられる。

非経口投与には、液体単位適量形式は、チオレドキシン化合物と無菌ビヒクル（水が好適）を利用してつくられる。

チオレドキシン化合物を使用形式と濃度に応じてビヒクルに溶解できる。溶液をつくるには、チオレドキシン化合物を注射用水に溶解し、ろ過滅

菌してから、適当なバイアルやアンプルに充填し、密封できる。局所鎮痛剤、防腐剤及び緩衝剤のような助剤をビヒクルに溶解するのが有利である。チオレドキシンを還元型で有利に投与できる。還元型は、酸化型をジチオスレイトールのような任意の数の糖の糖アルコール還元体で処理することによって得られる。

経口及び非経口投与のほか、点眼及びちうちう注射剤を利用できる。チオレドキシン化合物を滴薬によって投与できる。経口投与に懸点をもつビヒクルが、滑けやすいビヒクルを利用できる。例えば、ゴアバクターと種々のポリエチレングリコール（カーボワックス）がビヒクルとして役立つ。

鼻内点滴注入には、液体単位適量形式はチオレドキシン化合物と、適当な薬学ビヒクル（水が好適）を利用するか、又は適当な乾燥粉末によってつくられる。

エアゾル用には、チオレドキシン化合物を気体又は液体推進剤、例えばジクロロジフルオロメタン、炭酸ガス、窒素、プロパン等と一緒に、また

必要ないし希望に応じて共溶媒と溶剤剤のような通常の助剤を加えて、加圧エアゾル容器に包装することができる。

本明細書で使用する用語「単位適量形式」は、ヒト及び動物患者にとって単位適量に適した物理的に区分される単位であり、各単位は必要な薬学増量剤、阻体又はビヒクルと組合わせて、望んでいる治療効果をつくりだすために計算された所定量のチオレドキシン化合物を含有している。本発明の新規な単位適量形式の仕様は、(a)活性材料すなわちチオレドキシン化合物の腫瘍の性質と、達成すべき特定治療効果、及び(b)ヒトの治療用にこのような活性材料をコンパウンドする技術に固有の限界、に支配され直接に依存している。本発明による適当な単位適量形式の例は錠剤、カプセル剤、トローチ、蜜膏、散薬包、ウェハー、ガシエ、茶さじ、大さじ、調びん、アンプル、バイアル、以上の任意のものの分離した装置のもの、及び本明細書に記述された他の形式である。例えば、抗炎症剤として使用されるチオレドキシン化

合物は、この技術で入手の容易な薬学材料、また確立された手順でつくることができる薬学材料を使用して、単位適量形式で容易につくることができる。種々の適量形式に適したチオレドキシン化合物量を容易に決定できる。適当な適量の調整は、必要を受けるホストの年齢、体重、及び全体的状態を考慮して、処置状態の程度に見合うように容易に行なうことができる。

チオレドキシンはエルマンズ試薬又は種々の蛋白質中に天然に存在するような典型的な有機化合物中のジスルフィドを還元する能力を有する低分子量のジチオール蛋白質である。（ホルムグレン エー、[1981] Trends in Biochemical Science 6, 25-39）。

本発明の範囲内にあってまとめてチオレドキシン化合物と呼ぶチオレドキシン及びチオレドキシンに由来するか又はチオレドキシンのジチオールペプチドは以下の化合物によって例示される。
(1) 大腸菌から単離されるチオレドキシン（ラウレント ティー・シー、モアー イー・シー、及びラ

イヒヤード ビー. [1984] J. Biol. Chem. 259, 3436-3445)

(2) 菌の種から単離されるチオレドキシン類、例えば酵母から単離されるチオレドキシン (ボルケジー、ビー、バムデスチン エー、及びライヒヤード ビー. [1970]、J. Biol. Chem. 245, 2362-2379); *Cyanobacterium* (グリフソン エフ、ケー、及びホルムグレン エー. [1983] 「チオレドキシンズ、ストラクチャーアンドファンクション」 [ビー、ガダル 編] Editions du Centre National de la Recherche Scientifique) ; ラット (ral) (グエララ ジー、モアー イー、シー、及びワード ディー、エム、エス. [1983] 上記); *T. バクテリオファージ* (ゾダーバーク B-0、スジョベルグ B-N、ゾンネルシュタム ユー、及びブランデン C-1 [1978] Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5827-5830); 哺乳類チオレドキシンの精製 (ルスマ エム、及びホルムグレン エー. [1982] Biochem. 121, 6628-6633); 更に人を培養と作るチオレドキシンを本発明で使用する事が出来る。

ールペプチド類。これらのチオレドキシン類のジチオールペプチドはレドックス活性ジスルフィドを形成する一対のシステイン残基を含有する特徴を一般に有する。この例には天然の原に由来するもの又は合成的に精製されたペプチドが含まれ、これは上に開示した同じレドックス活性ペプチド配列、例えば大腸菌チオレドキシン中の Cys-Gly-Pro-Cys 又は Cys-Gly-Pro-Cys-Lys 又は Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys、又は *T. バクテリオファージ* によってコードされるような他のチオレドキシンからの類似配列 Cys-Val-Tyr-Cys (Cys=システイン、Val=バリン、Tyr=チロシン) が含まれる。(ゾダーバーク B-0、スジョベルグ B-N、ゾンネルシュタム U、及びブランデン C-1 [1978] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5827-5830)。他のチオレドキシン類のペプチドには固有のチオレドキシン様の活性を有するプロチオニン類と呼ばれる種蛋白質の類が含まれる (ワグナー、及びビヤナビー、ビー. [1983] 「チオレドキシンズ、ストラクチャーアンドファンクション」、[ガダル、ビー、編]

(3) 上記実施例 1 に記載されるような無菌のチオレドキシンの調製によって造られるペプチドを表しているチオレドキシンに由来するジチオールペプチド類。チオレドキシンに由来するこの類のそのような例の一つは 1-37 の残基 (即ち T 1-37) を含有する断片であって大腸菌からのチオレドキシンのシアノゲンプロマイド調製によってつくられるものを含有している断片である。これらのチオレドキシンに由来する、及びチオレドキシン様のジチオールペプチドの重要な特徴はこれらがレドックス活性ペプチド配列 Cys-X-Y-Cys (ここで X と Y は 20 のアミノ酸の任意のものである) を含有しているということである。例えば大腸菌チオレドキシンからのレドックス活性ペプチド配列は Cys-Gly-Pro-Cys (Cys=システイン、Gly=グリシン、Pro=プロリン) である。またレドックス活性配列 Cys-Gly-Pro-Cys-Lys 又は Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys を使用できる (Lys=リジン)。

(4) なかでも抗原質ジスルフィドの還元を触媒する固有の能力を有するチオレドキシン様のジチオ

Editions du Centre National de la Recherche Scientifique)。

チオレドキシンは大腸菌菌株 B の市販の原から (グレンプロセッシングコーポレーション、ミネソタ州ミネアポリス) 又は標準の手順によって成育される一般の大腸菌株の幾つかの任意のものから (ビジュット、ブイ、及びコンレイ、アール、アール [1977] J. Biol. Chem. 252, 6367-6372) の何れから精製される。蛋白質はイオン交換及び分子篩カラム上のクロマトグラフィを含む標準の手順を用いて精製される (ウィリアム、シー、エッチ、ジャネフティ、ジー、アルスコット、エム、ディー、及びマックアリスター、ジニー、ケー. [1987] J. Biol. Chem. 262, 5228-5231; マックエボイ、エム、ランツ、シー、ルン、シー、エー、及びビジュット、ブイ. [1983] J. Biol. Chem. 258, 6646-6650)。

チオレドキシン蛋白質は上記マックエボイ等に記載されるように定量的なロケット免疫電気泳動を用いて免疫的に検定される。

以下は本発明を説明する最良の態様を含んだ実施例である。これらの実施例は制限するものと解釈すべきでない。全ての溶媒混合割合は他に記載されていなければ任意による。

実施例1 チオレドキシン断片T-1-37とT-18-38(α)シアノゲンプロマイド(シグマケミカル)を70%塩酸中に溶解し、50倍モル過剰のメチオニン中のチオレドキシンに加えた。溶液を室温でバブジし、室温で暗いなかで24時間培養した。培養反応の完了時に溶液を室温下で乾燥し、酢酸ナトリウム緩衝液中に再懸濁し、pH8.5に水酸化アンモニウムで調整した。

試料をベックマンモデル421分離(カリフォルニア州フルーティングのベックマンインストラメンツインコーポレーテッドの商標)に取り付けられたウォーターズμ-ボンデパック(Waters μ-Bondapak)C-18カラム(マサチューセッツミルフォ

ードのウォーターズアソシエーツインコーポレーテッドの商標)に装填し、214nmでモニターした。使用した溶媒系は0.1%トリフルオロ酢酸(緩衝液A)及びのアセトニトリル中の0.08%トリフルオロ酢酸(緩衝液B)であった。30分間わたる0%~60%のBの勾配をペプチドを分離するのに流速2ml/分に於いて使用した。

チオレドキシンはC8H9によって二つの断片、即ちT-1-37及びT-18-38に分解し、44%及び51%の緩衝液Bで夫々分離した。アミノ酸分析は両方のペプチドの組成を決定し、且つ確認した(ホルムグレン、ユー、及びライヒャード、ビー、[1987] Eur. J. Biochem. 2, 187-198)。T-1-37は酵素の活性部位を含有していた。回収された二つのペプチドは出発物質の89%に当った。未反応チオレドキシンは損失の12~15%にあたり一方HPLC分離はそれ以外の損失の原因となった。

(b)トリプシン開裂によるT-18-38の製造

上記のHPLC分離の後、T-1-37を蒸発、乾燥し、酢酸ナトリウム緩衝液中に再懸濁し、NH₄OH

でpH 8.0に調整した。トリプシンの一部分(シグマケミカル)を培養に1%(v/v)のペプチド濃度で加えた。反応混合物を37℃で1時間培養した。トリプシン断片の分離をHPLCでシアノゲンプロマイド断片に対すると同じ様に行った。

T-1-37ペプチドのトリプシン消化は二つのペプチド、即ちT-4-16及びT-18-38を生成し、これらはHPLCで31%及び45%の緩衝液B中で夫々分離して分離された。アミノ酸分析は31%Bに於いて分離される種類のものが15%のアミノ酸を含有し、活性部位ペプチドT-18-38に対応していることを明らかにした。90nmolのT-1-37の培養は80nmolのT-18-38をHPLCでの分離の収率88%で造った。

実施例2

脂質の過酸化は、ある毒性状態、薬剤で誘発される状態、及び病状状態の中で細胞内に起こることが知られている過程である[エルストマー・イー、エフ(Elstner, E.F.)(1982年) Ann. Rev. Physiol. 33巻73-89頁; カッパス・エッチ(Kap-pus, H.)(1985年)「酸化ストレス」(エッチ・

シーズ)273-310頁、アカデミックプレス社、ニューヨーク・ロンドン]。脂質の過酸化は脂質ラジカルの形成と伝播、酵素阻害、不飽和脂質の二重結合の再配置及び脂質の最終的破壊を行い、種々の分解生成物を生ずるが、その一つがマロジナルデヒドである[前掲カッパス・エッチ(1985年)]。

マロジナルデヒド(MDA)の形成から評価されるミクロソーム脂質の過酸化は、チオレドキシン(酸化型と還元型)によって抑制された。溶液をすべて、使用前にチレックス(chetex)処理した。ラット肝臓ミクロソーム(1ml当たりミクロソームタンパク0.5 mg)、アデノシン二磷酸(ADP)-Fe²⁺(1.7 mM ADP, 0.1 mM FeCl₃)及びニコチンアミドアデニンジヌクレオシド(NADPH)(0.1 mM)を含有する培養液は、酸濃度と同じ濃度(すなわち0.1 mM)のチオレドキシンによって酵制された。チオレドキシン濃度を変えて、MDA形成とチオレドキシン濃度との作図で滴定曲線が得られる。曲線の傾斜は比較的急であり、酸との非常に強い相

相互作用を示唆している。酸化還元両型のチオレドキシンは類似行動をとる能力は、ミクロゾームがチオレドキシンを還元する能力と、チオレドキシがミクロゾームの脂質二重層に結びつく能力とに反映しうる。DDT(0.4及び1.28 mM)は培養混合物中に含まれると、HbA生産量の増加量(それぞれ対照に対して1,016%及び781%)で評価されたとおり、ミクロゾーム脂質の過酸化を促進した。これは、チオレドキシ作用が、他のジチオールではまねのできないほど独特であることを示している。

実施例3

チオレドキシンはSPLCでの測定のとおり、遷移金属類と相互に作用し合う。鉄が存在すると、本来のチオレドキシに相当するピークが崩れ、同時に第二の峰が出現する。この第二の峰の形成は鉄濃度に依存していた。このように、チオレドキシは鉄と相互に作用し合って安定な錯体形成する。結果は、EDTAの錯和力に比肩するか、それよりすぐれた錯和力で、チオレドキシが鉄とキ

レート化することを示している。同様な結果は、銅との場合にも観察された。

実施例4

実施例2と3のチオレドキシンの代わりに実施例1で得たチオレドキシ断片T₁₋₂₇又はT₁₀₋₃₀、又はT₁₁₋₃₀(実施例6)を使用して、本質的に同じ結果が得られる。

実施例5

実施例2と3のチオレドキシンの代わりに、酸化還元活性ペプチド配列Cys-X-Y-Cys-Lys、Cys-X-Y-Cys、又はTrp-Cys-X-Y-Cys-Lys(式中XとYは同じもの又は異なるものであり、20個のアミノ酸の任意のものでありうる)を含むチオレドキシで置換された、又はチオレドキシ様のジチオールペプチドを使用して、本質的に同じ結果が得られる。

実施例6

ラジカル形成を予防する能力について、チオレドキシを幾つかの鉄キレート剤(即ちEDTAとデスフェリオキサミン)と比較した。鉄触媒によ

るヒドロキシル基の形成(ヒポキサンチン及びキサンチンオキシダーゼによりO₂として発生)を、ジメチルスルホキシドとの反応によるホルムアルデヒドの形成によって監視した[グラフ・イー(Graf, E.)ら(1984年) J. Biol. Chem. 259巻3620-3624頁]。50 mMトリス(pH7.4)、50 μ M Fe³⁺、250 μ Mキレート剤(又はチオレドキシ)、50 mMジメチルスルホキシド、300 μ Mヒポキサンチン及びキサンチンオキシダーゼ18ミリ単位のトリブレート1.0 ml試料を37°Cで30分培養した。溶液をすべて、使用前にチェレックス(chellex)カラムに通した。キサンチンオキシダーゼの添加によって反応を開始し、100%トリクロロ酢酸50 μ lの添加によって終了させた。ホルムアルデヒドをハンチ(Hantzsch)反応[ナッシュ・ティアー(Nash, T.) (1953年) Biochem. J. 55巻416-421頁]により比色法で決定した。チオレドキシ(酸化型と還元型)及びデスフェリオキサミンは250 μ Mで、ホルムアルデヒドが検出されないまでに鉄の全触媒活性を抑制した。一方、250 μ MのEDTAは、対照(キ

レート化剤なし)の30分当たりホルムアルデヒド26.9 \pm 1.3 nmolに比べて、30分当たりのホルムアルデヒド7.1 \pm 0.8 nmolの率を与えた。このように、チオレドキシはラジカル形成の抑制にデスフェリオキサミンとして行動するが、EDTAにはそのような行動はできない。

実施例7

チオレドキシは、鉄触媒による酸化還元系に依存する脂質過酸化系においてアラキドン酸メセルの過酸化を抑制した。すべての溶液は、外來金属イオンを除くために、使用前にチェレックス(chellex)で処理された。培養液はアラキドン酸(0.081 μ g/v LUGROL-PX[シグマ・ケミカル社、ミズーリ州セントルイス]を加えた懸濁液中0.2 mg/ml)、アデノシン二磷酸(ADP)·Fe³⁺(0.5 mM ADP, 0.1 mM FeCl₃)、0.33 mMキサンチン及びキサンチンオキシダーゼ(0.1単位/ml)を含む。NDA形成は、鉄と同じ濃度(すなわち0.1 mM)のチオレドキシ(酸化又は還元型)によって完全に抑制された。NDA形成の抑制は、酸化型チオレドキ

シン濃度と直線的に比例していた。デスフェリオキサミンを使用して同様な曲線が生じ、0.1 mM NDAで抑制率は100%であった。還元型チオレドキシンを使用して同様な曲線が生じたが、約0.05mMチオレドキシンで抑制率は100%であった。酸化型チオレドキシンが濃度依存的なNDA形成の低下をもたらす能力は、(1)還元型チオレドキシンが還元型チオレドキシンを還元し、これが今度は鉄をキレート化する；又は(2)酸化型チオレドキシンがスルフィドリル又は他のアミノ酸残基、すなわちトリプトファン、ヒスチジン等を通してラジカル除去剤として働く、という事実のためである。還元されたチオレドキシンと、ヨードアセトアミドでカルボキシメチル化されたチオール類は、0.1 mMで23%の抑制率というわずかな濃度依存的なNDA形成の抑制をもたらした。この結果は、還元型チオレドキシンが活性部位のスルフィドリルを経て鉄との相互作用を通して脂質の過酸化を抑制することを強く示唆している。チオレドキシン

活性部位の配列をもつジチオールペプチドを使用して脂質過酸化研究を実施した。ペプチドT₂₁₋₂₈のTrp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lysは、メリフィールド(Merrifield) J. Am. Chem. Soc. (1964年)85巻2149頁に記述されたような慣用の固体相手順によって合成された。T₂₁₋₂₈ペプチドが脂質過酸化を抑制する能力は、無害のタンパクの効力と同様であった。酸化型ペプチドはペプチド濃度に比例して(すなわち酸化型チオレドキシンとデスフェリオキサミンで阻害されるとおり) NDA形成を抑制した。還元型ペプチドは約0.05 mMで(すなわち還元型チオレドキシンで阻害されるとおり) NDA形成を完全に抑制した。

また本発明の範囲には、チオレドキシン化合物類のナトリウム又はカリウム塩、又はグアニジンのような有機強塩基との塩類のような薬学的に受け入れられる塩類も含まれる。その他、これらの陽イオンの、並びにチオレドキシン化合物中のリジン残基のカウンターイオン類、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、

リンのこの塩は塩のいずれのものである、というのは、チオール化合物類(すなわちシステイン、グルタチオン、DBT)が脂質の過酸化を起こし、かつ促進することが、文献に記述されているからである〔ローリー・ディー・エイ(Rowley, D.A.)及びハリエル・ビー(1982年) FEBS Lett. 138巻33-86頁； Bucherら(1982年)「オキシラジカルとその除去系」(Oxy Radicals and Their Scavenger Systems)1巻370-383頁(コーエン・ジー及びグリーンワールド・アール・エイ編)；ティーン(Tien)ら(1982年) Biochem. Biophys. Res. Comm. 107巻279-285頁〕。

還元型チオレドキシンがデスフェリオキサミンより有効(約2倍)であることは、注目し得よう。デスフェリオキサミンは鉄のキレート化によって抑制するから、還元型チオレドキシンは鉄のキレート化とは別の、又はそれに加えて、何らかの阻害防止作用をもっているに違いない。

実施例1

実施例1に記載のように、大腸菌チオレドキシン

脂酸塩、くえん脂酸、安息香脂酸、こほろ脂酸、りんご脂酸、アスコルビン脂酸等も、製剤中に包含できる。

また本発明の範囲には、ジチオール配列の(Trp)-Cys-X-Y-Cys-Lysを含有し、アミノ及び/又はカルボキシル基、特に荷電を中性にするような基をもったペプチドが含まれる。アミノ基の例はアシル1-18C、例えばアセチル及び第三プロピルカルボニルを包含する。カルボキシル基は低級アルキルエステル類、例えばエチル及びメチル、及びアミド基を包含する。

アシル類は、当業者に周知の標準的なアシル化条件を用いてつくることができる。アシル化に使用される脂類は以下を包含する。(a)飽和又は不飽和の直鎖又は分枝鎖脂肪族カルボン酸、例えば酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸、第三ブチル酢酸、古草酸、イソ古草酸、カプロン酸、カプリル酸、デカン酸、ドデカン酸、ラウリン酸、トリデカン酸、ミリスチン酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、アク

リル酸、クロトン酸、ウンデシレン酸、オレイン酸、ヘキシン酸、ヘプタン酸、オクタン酸等；(b)飽和又は不飽和の脂環式カルボン酸類、例えばシクロブタンカルボン酸、シクロペンタンカルボン酸、シクロヘキサンカルボン酸、メチルシクロペンタンカルボン酸、シクロヘキサンカルボン酸、ジメチルシクロヘキサンカルボン酸等；(c)飽和又は不飽和脂環式脂族カルボン酸、例えばシクロペンタン酢酸、シクロペンタンプロピオン酸、シクロヘキサン酢酸、シクロヘキサン酪酸、メチルシクロヘキサン酢酸等；(d)芳香族カルボン酸、例えば安息香酸、トルイル酸、ナフトエ酸、エチル安息香酸、イソブチル安息香酸、メチルブチル安息香酸等；及び(e)芳香族脂環式カルボン酸、例えばフェニル酢酸、フェニルプロピオン酸、フェニル古草酸、桂皮酸、フェニルプロピオール酸、及びナフトール酢酸等。

出願人 レブリゲン コーポレーション

代理人 弁理士 佐々井孝太郎 (外 1 名)